

Rola pozakomórkowego DNA w biofilmach prokariotycznych i eukariotycznych

Magdalena Smolarz

Zakład Biochemii Porównawczej i Bioanalityki

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

magdalena.smolarz@student.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką dr hab. Marii Rapały-Kozik, prof. UJ

Intensywne namnażanie się bakterii i grzybów w danym środowisku prowadzi do formowania przez te mikroorganizmy przestrzennych struktur nazywanych biofilmami. Aktualne badania wskazują, iż biofilmy pełnią jedną z kluczowych ról w rozwoju poważnych chorób infekcyjnych, stanowiących często zagrożenie życia dla osób z obniżoną odpornością. Szereg wydzielanych przez patogeny składników tworzy zewnątrzkomórkową macierz stanowiącą szczelną barierę chroniącą mikroorganizmy przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Poznanie roli poszczególnych komponentów macierzy stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki. Okazuje się, że szczególnie ważną rolę w formowaniu macierzy pełni pozakomórkowe DNA (ang. *extracellular DNA*, eDNA), uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez mikroorganizmy tworzące biofilm. Ostatnie lata badań wykazały, że eDNA jest jednym z głównych składników wpływających na integralność całej struktury, ponadto może ono utrudniać penetrację biofilmów przez antybiotyki i tym samym brać udział w rozwijaniu lekooporności. Dokładne poznanie mechanizmów tworzenia biofilmów i funkcji poszczególnych ich komponentów ma kluczowe znaczenie w opracowywaniu nowoczesnych leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat funkcji pozakomórkowego DNA w biofilmach prokariotycznych i eukariotycznych oraz możliwości wykorzystania leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy w zwalczaniu infekcji.

Wstęp

Niemal każde środowisko na Ziemi zasiedlane jest przez różne gatunki mikroorganizmów, które mogą wchodzić wzajemnie w złożone interakcje. Wspólny rozwój prowadzić może do postawiania biofilmów, czyli trójwymiarowych struktur tworzonych przez je-

den lub kilka gatunków mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych [1]. Biofilmy mogą powstawać w niezliczonej liczbie środowisk sztucznych oraz naturalnych i to właśnie warunki środowiskowe determinują specyficzne właściwości tych struktur. Życie w takich zorganizowanych społecznościach przynosi wiele

korzyści mikroorganizmom, ponieważ umożliwia m.in. przetrwanie w nieprzychylnych warunkach środowiska. Szacuje się, że ok. 97% masy całego biofilmu stanowi woda, natomiast pozostałe 3% to wydzielane egzopolisacharydy, białka, lipidy oraz zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA) [2]. Główną rolą tych składników jest zwiększanie adhezji mikroorganizmów do podłoża i utrzymywanie integralności całej struktury. Biofilmy oraz ich składniki mogą z jednej strony mieć znaczenie w utrzymywaniu prawidłowej homeostazy organizmu gospodarza, a z drugiej strony, pełnić rolę w rozwoju drobnoustrojów patogennych i lekooporności.

Struktura i formowanie biofilmów bakteryjnych

Każdego roku zwiększa się liczba badań naukowych dotyczących procesów tworzenia biofilmów, a otrzymywane wyniki wnoszą coraz więcej istotnych informacji na ich temat. Dotychczasowe obserwacje pokazują, że większość znanych gatunków bakterii jest w stanie rozwijać się i żyć w tak zorganizowanych społecznościach, a ponadto wydaje się, że jest to dominująca forma występowania większości mikroorganizmów w przyrodzie [3]. Proces tworzenia biofilmu jest długotrwały i złożony. Pierwszym etapem jest adhezja mikroorganizmu do podłoża. W procesie tym ogromną rolę odgrywają białka adhezyjne, specyficzne dla danego gatunku, oraz pozakomórkowe DNA. W kolejnych etapach, do miejsca powstania pierwszej monowarstwy na-

plywają kolejne komórki mikroorganizmów, co skutkuje tworzeniem wielowarstwowej struktury przestrzennej stabilizowanej przez szereg związków wydzielanych do przestrzeni pozakomórkowej określanych jako macierz biofilmu [4]. Do głównych jej komponentów w biofilmie bakteryjnym zalicza się egzopolisacharydy, stanowiące stabilne rusztowanie całej struktury. Ważną rolę w formowaniu biofilmów pełnią także białka powierzchniowe bakterii, które mogą być przyłączane do powierzchni komórek lub wydzielane na zewnątrz. Szczególnie ważną rolę odgrywają tu białka budujące fimbrie. Przykładem może być białko TasA, występujące u bakterii *Bacillus subtilis*, tworzące amyloidowe włókna, które umożliwiają ścisłe przyleganie komórek mikroorganizmu, a w konsekwencji tworzenie stabilnych struktur biofilmu [5]. W macierzy biofilmów prokariotycznych znajdują się również duże ilości eDNA, którego funkcja w ostatnich latach jest intensywnie badana [6].

Rola eDNA w biofilmach prokariotycznych

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) we wszystkich organizmach pełni rolę nośnika informacji genetycznej. Właściwości fizyczne DNA, takie jak wysoka lepkość oraz ujemny ładunek elektrostatyczny sprawiają, że może on poza komórką pełnić wiele innych funkcji, niezwiązanych z przekazywaniem informacji genetycznej.

W 2002 roku podczas badań nad biosyntezą alginianów u *Pseudomonas*

aeruginosa, zaobserwowano, że oprócz dużej ilości polisacharydów i innych związków organicznych, w macierzy biofilmu występują znaczne ilości kwasu nukleinowego [6]. Wykonano eksperyment polegający na suplementacji pożywki hodowlanej deoksyrybonukleazą (DNaza I). Zaobserwowano inhibicję tworzenia biofilmu hodowanego przez mniej niż 60 godzin. Badania te wykazały, że kwas nukleinowy znajdujący się w macierzy biofilmu ma kluczowe znaczenie dla formowania biofilmu bakteryjnego, szczególnie na jego pierwszych etapach. Biofilm rosnący przez minimum 84 godziny był zdecydowanie mniej wrażliwy na działanie DNazy I, co świadczy o pojawieniu się dodatkowych składników stabilizujących jego strukturę. Zewnątrzkomórkowe DNA, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, ułatwia przyleganie komórek do podłoża, dlatego też jego degradacja przez deoksyrybonukleazę ogranicza adhezję mikroorganizmów do podłoża, a to z kolei hamuje pierwsze etapy tworzenia tej zorganizowanej struktury. Ponadto w rozwijających się biofilmach degradacja eDNA utrudnia również agregację komórek bakteryjnych [7]. Wykazano również, że szczepy *Bacillus cereus* z mutacją genów *purA*, *purC* i *purL*, odpowiedzialnych za biosyntezę puryn, nie są w stanie prawidłowo formować biofilmów [8], co dodatkowo potwierdza wcześniejsze hipotezy. Dokładny mechanizm regulacji uwalniania eDNA nie jest do końca poznany. Udowodniono, że DNA znajdujące się w macierzy biofilmu nie różni się od genomowego, zatem postawiono hi-

potezę, że może być ono uwalniane w procesie autolizy. Autoliza u bakterii jest wynikiem aktywacji szlaków zależnych przede wszystkim od zjawiska „*quorum sensing*”, które między innymi umożliwia mikroorganizmom regulację ekspresji genów w zależności od gęstości populacji [9]. W przypadku *Ps. aeruginosa* wykazano, że genem regulującym uwalnianie DNA jest *pqsA*. Bakterie z mutacją genu *pqsA* wytwarzają bardzo niewielkie ilości cząsteczki sygnałowej PQS (ang. *Pseudomonas Quinolone Signal*), biorącej udział w aktywacji lizy. Kolejne badania pokazały, że uwalnianie eDNA u *Ps. aeruginosa* jest dodatkowo regulowane przez żelazo, które wpływa na aktywność genów *Pqs*. W dużym stężeniu wpływa ono na obniżenie ekspresji tych genów i w rezultacie skutkuje zmniejszeniem uwalniania DNA na zewnątrz [10]. *Ps. aeruginosa* wytwarza również szereg toksyn, m.in. piocyjaninę, która katalizuje reakcję zamiany tlenu w rodniki ponadtlenkowe i nadtlenek wodoru. Okazuje się, że istnieje zależność pomiędzy produkcją tego związku a uwalnianiem eDNA, ponieważ H_2O_2 indukuje wśród bakterii znajdujących się w biofilmie mechanizm autolizy [11]. Mogłoby się wydawać, że z jednej strony produkcja piocyjanianu jest zjawiskiem niekorzystnym dla pojedynczych komórek bakteryjnych, jednak należy pamiętać, że w kontekście całego biofilmu uwalnianie pozakomórkowego DNA ma kluczowe znaczenie. Oprócz mechanizmu autolizy pojawiają się również przykłady świadczące o możliwości uwalniania DNA za pomocą systemów sekrecji

[12]. Zaobserwowano, że Gram ujemne bakterie z gatunku *Neisseria gonorrhoeae* uwalniają duże ilości zewnątrzkomórkowego DNA podczas wykładniczej fazy wzrostu, wykorzystując IV system sekrecji (T4SS) [13]. Pojawiają się również przykłady transportu DNA na zewnątrz komórki za pomocą pęcherzyków błonowych [14]. Do tej pory mechanizm ten zaobserwowano u kilku gatunków bakterii Gram ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Myxococcus xanthus*) oraz Gram dodatnich (*Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*) [15].

Pomimo niewątpliwej roli w stabilizacji struktury biofilmów, eDNA odkrywa również ważną funkcję w horyzontalnym transferze genów, który jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za adaptację drobnoustrojów do warunków środowiska [16]. Do głównych mechanizmów wymiany DNA pomiędzy bakteriami zaliczyć należy transformację, koniugację oraz transdukcję. Skupiska pozakomórkowego DNA stanowią dużą pulę genów, które mogą być przekazywane pomiędzy mikroorganizmami należącymi do tych samych lub różnych gatunków. Transformacja jest bardzo szybkim mechanizmem, dzięki któremu możliwe jest rozprzestrzenianie genów kodujących między innymi czynniki wirulencji oraz lekooporność [17, 18]. W procesie tym biorą udział mikroorganizmy charakteryzujące się tzw. kompetencją, czyli zdolnością do przyjmowania DNA ze środowiska. Na podstawie badań horyzontalnego transferu genów u niektórych gatunków paciorkowców

wykazano, że kompetencja jest wynikiem aktywacji szlaku sygnałowego ComDEX przez peptyd CSP (ang. *competence-stimulating peptide*) [19]. Mutanty nieposiadające zdolności do kompetencji tworzą biofilmy o znacznie zredukowanej biomacie [20]. Transfer genów oporności na antybiotyki opisano między innymi dla biofilmu tworzonego przez dwie bakterie pospolicie występujące w jamie ustnej: *Veillonella dispar* oraz *Streptococcus mitis*. Zaobserwowano, że oczyszczone DNA pochodzące z *Veillonella dispar* może transformować bakterie *S. mitis*, co skutkuje pojawieniem się genów oporności na tetracyklinę u paciorkowca [21].

Struktura i formowanie biofilmów eukariotycznych

Struktura biofilmów eukariotycznych jest stosunkowo słabo zbadana. Najlepiej poznanymi są biofilmy tworzone z udziałem polimorficznych, oportunistycznych drożdżaków z rodzaju *Candida*, które są składnikami naturalnej mikroflory u prawie 80% populacji człowieka. Drożdżaki z gatunku *Candida albicans* wywołują u osób z obniżoną odpornością poważne infekcje – kandydozy. Podobnie jak w przypadku bakterii, możemy wyróżnić trzy etapy tworzenia biofilmów drożdżowych. Pierwszym etapem jest adhezja komórek do podłoża, następnie dochodzi do zmiany formy morfologicznej z komórkowej na strzępkową (filamentną), a także rozpoczyna się produkcja i uwalnianie składników macierzy tworzącej biofilm [22]. Macierz zewnątrz-

komórkowa w biofilmie eukariotycznym składa się głównie z węglowodanów, ale występują w niej również białka, aminocukry, kwas uronowy, reszty fosforanowe oraz znaczne ilości DNA [23, 24]. Patogenne grzyby mają zdolność do ścisłego przylegania do różnych powierzchni wewnątrz organizmu gospodarza, takich jak na przykład śródbłonek naczyń krwionośnych i błony śluzowe. Ponadto drożdżaki bardzo często kolonizują sztuczne implanty, zastawki i sprzęty medyczne, stanowiąc groźne dla życia źródła wtórnego zakażenia [25]. Adhezję do podłoża i agregację komórek grzybów tworzących biofilm umożliwiają białka – adhezyny, które najlepiej zostały opisane w przypadku drożdżaków *C. albicans*. Główną grupą adhezyn występujących u *C. albicans* są glikoproteiny z rodziny Als (ang. *agglutinin-like sequence*). Przyleganie do błon śluzowych umożliwiają głównie białka Als1, Als2 i Als4, z kolei Als1 oraz Als3 wraz z adhezyną Hwp1 (ang. *hyphal wall protein*) umożliwiają zlepianie za sobą strzępek, co pozwala na tworzenie rozbudowanych struktur [26]. Kolejną ważną adhezyną jest białko Eap1 (ang. *enhanced adherence to polystyrene*), strukturalnie bardzo podobne do białek z rodziny Als. Uważa się, że jego główną funkcją jest umożliwianie adhezji do sztucznych powierzchni polistyrenowych oraz do nabłonka nerkowego [27]. Białek umożliwiających przyleganie do różnych powierzchni odkrytych u *C. albicans* oraz u innych patogennych grzybów takich jak *Cryptococcus neoformans* czy *Aspergillus fumigatus* jest jednak znacznie więcej [28].

Rola eDNA w biofilmach eukariotycznych

Selektywna degradacja składników macierzy dojrzałego biofilmu formowanego przez *C. albicans* za pomocą proteiny K i chitynazy skutkuje obniżeniem adhezji drożdżaka do podłoża [22]. Większość aktualnie prowadzonych badań koncentruje się jednak na wyjaśnieniu funkcji eDNA. Okazuje się, że ilość pozakomórkowego DNA jest ściśle skorelowana z etapem tworzenia biofilmu. Dodanie DNazy I nie wykazuje znacznego wpływu na formowanie biofilmu drożdżowego na pierwszych etapach formowania, w przeciwieństwie do biofilmów bakteryjnych [24]. Dopiero dodanie DNazy I do dojrzałego biofilmu, rosnącego przez minimum 48 godzin, powoduje spadek integralności powstałej struktury. Wydaje się zatem, że pozakomórkowe DNA jest kluczowym składnikiem zapewniającym stabilność dojrzałego biofilmu eukariotycznego, natomiast nie jest niezbędne na etapie adhezji drożdżaka do podłoża. W początkowych fazach rozwoju biofilmu drożdżowego kluczową rolę pełnią przede wszystkim liczne adhezyny. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku grzybów z gatunku *A. fumigatus* [29]. W celu potwierdzenia funkcji DNA w biofilmach drożdżowych wykonano doświadczenie polegające na dodaniu niewielkiej ilości egzogennej DNA pochodzącej z *C. albicans* oraz patogenów związanych z zapaleniem płuc: *Ps. aeruginosa* i *S. aureus* do struktur tworzonych przez *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Zaobserwowano

powstanie gęstej sieci komórek otoczonych dużą ilością eDNA. Zaskakujący wynik uzyskano, gdy egzogenne DNA dodawane było w bardzo dużej ilości (powyżej 10 µg/ml). Zaobserwowano wówczas spadek masy biofilmu, co może świadczyć o roli DNA w inhibicji wzrostu i promowaniu odrywania komórek od podłoża w celu kolonizacji innych powierzchni, w momencie osiągnięcia przez biofilm dojrzałej struktury [30].

Mechanizm uwalniania eDNA przez organizmy eukariotyczne nie jest do końca poznany. Uwalnianie eDNA przez bakterie jest głównie związane ze zjawiskiem „*quorum sensing*”, które indukuje procesy autolizy, jednak poznano do tej pory zaledwie kilka związków biorących udział w tym zjawisku u organizmów eukariotycznych [9]. W przypadku *C. albicans* substancje te odpowiedzialne są za regulację zmiany formy morfologicznej drożdżaka, która w dużej mierze zależy od gęstości komórek. W zagęszczeniu większym niż 10⁶ komórek/ml obserwuje się silną inhibicję strzępkowania spowodowaną produkcją farnezołu [31]. Jednak badania z wykorzystaniem mutanta *C. albicans chk1/chk1*, pozbawionego kinazy histydynowej, biorącej udział między innymi w przekazie sygnału modulowanego przez farnezoł [32], wykazały brak znaczącej roli tego związku w aktywacji uwalniania eDNA [24]. Wpływ innych cząsteczek biorących udział w „*quorum sensing*” nie został jeszcze poznany. Podejrzewa się, że za uwalnianie pozakomórkowego DNA może być również odpowiedzialny proces oparty na aktywności chity-

naz [33]. Do tej pory odkryto cztery geny kodujące chitynazy u *C. albicans*. Geny *CHT2* oraz *CHT3* są odpowiedzialne ze regulację zmiany formy morfologicznej i wykazują szczególnie wysoką aktywność w formie strzępkowej [34]. Wykazano, że chitynazy kodowane przez te geny są aktywne w momencie uwalniania eDNA, zatem można podejrzewać, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy uwalnianiem eDNA i tworzeniem formy strzępkowej [33].

Wpływ pozakomórkowego DNA na stabilizację biofilmów mieszanych

W warunkach naturalnych większość poważnych infekcji jest związana z występowaniem tzw. biofilmów mieszanych, utworzonych z kilkunastu gatunków bakterii i grzybów. Formowanie wielogatunkowych biofilmów obserwuje się bardzo często m. in. na powierzchni zębów oraz dziąseł. Wykazano, że bakterie wchodzące w skład tych struktur (np. *S. mutans*, *S. gordonii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum* oraz *Porphyromonas gingivalis*) uwalniają znaczne ilości eDNA [35]. Podobnie jak w przypadku biofilmów jednogatunkowych, zaobserwowano, że DNA odgrywa kluczową rolę w początkowych etapach formowania mieszanych biofilmów, natomiast ich forma dojrzała stabilizowana jest głównie przez polisacharydy. Wyniki badań *in vivo* oraz *in vivo* prowadzonych na biofilmach tworzonych przez *Staphylococcus epidermidis* i *C. albicans* w obrębie wklucia centralnego u myszy wskazują na zwiększoną ilość

pozakomórkowego DNA i zdecydowanie większą stabilność w porównaniu do struktur tworzonych niezależnie przez wskazane gatunki mikroorganizmów [36]. Wykazano, że przyczyną zwiększonej ilości eDNA w macierzy jest zmniejszenie ekspresji genów zlokalizowanych w operonie *lrg* *S. epidermidis*, odpowiedzialnych za powstanie białek będących represorami autolizy [37]. Ponadto zaobserwowano zwiększone rozprzestrzenianie *S. epidermidis* w obrębie wklucia centralnego u myszy, co przekładało się na dynamiczny rozwój infekcji i skutkowało wzrostem śmiertelności zwierząt. Bardzo często w biofilmach mieszanych obserwowane jest przyleganie bakterii do strzępek. Prawdopodobnie drożdżaki mogą pełnić funkcję szkieletu, na którym rozwija się biofilm bakteryjny, dzięki temu strzępki ułatwiają kolonizację tkanek gospodarza i rozprzestrzenianie infekcji bakteryjnych [36].

eDNA jako czynnik wirulencji mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych

Większość składników macierzy biofilmu może być rozpoznawana przez komórki układu odpornościowego człowieka za pośrednictwem receptorów rozpoznających wzorce [38]. Bakteryjne DNA uwolnione w trakcie fagocytozy uruchamia produkcję cytokin przez aktywację receptora TLR9, znajdującego się na błonie endosomu fagocytów. TLR9 rozpoznaje niemetylowane motywy CpG charakterystyczne dla bakteryjnego DNA [39]. Badania z ostatnich lat pokazują, że

również pozakomórkowe bakteryjne DNA znajdujące się w macierzy może pośredniczyć w aktywacji komórek układu odpornościowego. Dodanie do rosnącego biofilmu tworzonego przez *Ps. aeruginosa* DNazy I, skutkuje zmniejszeniem produkcji IL-8 i IL-1 β przez neutrofile, co może wskazywać na istotną rolę eDNA w indukcji stanu zapalnego [39]. Zaobserwowano także, że niektóre mikroorganizmy są zdolne do unikania rozpoznania na tej drodze, czego przykładem mogą być bakterie *N. gonorrhoeae*. Bez indukcji autolizy, lecz za pośrednictwem T4SS bakterie te uwalniają metylowane DNA, przez układ immunologicznego gospodarza nie jest aktywowany [13].

Do tej pory rola eDNA w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej przez *C. albicans* oraz inne patogeny eukariotyczne nie została jeszcze dokładnie zbadana, jednak można podejrzewać, że podobnie jak w przypadku bakterii, DNA będzie aktywowało odpowiedź immunologiczną. Do tej pory wykazano, że w przypadku biofilmów tworzonych przez *C. albicans* obserwuje się zmienioną odpowiedź komórek układu odpornościowego w porównaniu do hodowli planktonicznych. Różnice widać przede wszystkim w odpowiedzi komórek fagocytujących. Zaobserwowano, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral mononuclear blood cells*, PBMCs) migrują przez strukturę biofilmu bez indukcji fagocytozy, ponadto, paradoksalnie, promują rozwój biofilmu [40]. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że za indukcję wzrostu biofilmu odpowiada niezidentyfikowany związek uwalniany do nad-

sączy przez PBMCs. Ponadto wydzielanie tej substancji może być indukowane przez komponenty ściany komórkowej *C. albicans*, jednak do tej pory nie wytłumaczono w pełni tego procesu. W przypadku interakcji monocytołów, dotychczasowe badania pokazały, że nie otaczają one biofilmu tworzego przez *C. albicans* i wydają się być wręcz nieaktywne w infekcjach grzybiczych [41].

Tworzenie biofilmów leży u podstaw wielu chorób infekcyjnych, których skuteczne zwalczanie jest niezwykle trudne. Zaobserwowano, że mikroorganizmy tworzące biofilm charakteryzują się zwiększoną antybiotykoopornością. Występowanie zjawiska lekooporności jest jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Początkowo uważano, że zewnątrzkomórkowa macierz stanowi pewnego rodzaju barierę uniemożliwiającą przedostawanie się różnych związków do wnętrza biofilmu [42]. Częsteczki antybiotyków mogą być wiązane z komponentami macierzy, co utrudnia ich dyfuzję. Jednak jest to efekt krótkotrwały i w przypadku długotrwałej antybiotykoterapii obserwuje się narastającą dyfuzję antybiotyków [43]. Zaobserwowano na przykład, że szczep RP62A *S. epidermidis*, dzięki uwalnianiu dużej ilości zewnątrzkomórkowych polimerów, uniemożliwia przedostawanie się flukonazolu do komórek drożdżaków, z kolei obecność *Candida* wpływa na zmniejszenie wrażliwości gronkowców na wankomycynę [44], co niezwykle utrudnia zwalczanie takich mieszanych infekcji. Kilka lat temu odkryto także zupełnie

nową funkcję eDNA. Okazuje się, że pozakomórkowe DNA może wiązać występujące w środowisku jony np. magnezu, pełniąc funkcję chelatora. Niedobór jonów magnezu jest sygnałem indukującym systemy PhoPQ i PmrAB, które odpowiadają za wzrost oporności na kationowe peptydy przeciwbakteryjne (ang. CAPs) [45] oraz na aminoglikozydy u *Ps. aeruginosa* [43]. Problem oporności na antybiotyki nie dotyczy tylko biofilmów bakteryjnych. Większość infekcji o podłożu grzybiczym jest trudna do zwalczenia za pomocą związków przeciwgrzybiczych. Szczególnie groźne i trudne w zwalczeniu są infekcje wywołane przez *C. albicans*, występujące u osób z obniżoną odpornością. Podobnie jak w przypadku biofilmów prokariotycznych, mechanizmów oporności na antymikotyki można doszukiwać się wśród składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku biofilmów tworzonych przez *C. albicans* zbadano zależność pomiędzy dodatkiem DNazy I, a wzrostem wrażliwości na niektóre popularne antymikotyki takie jak amfoterycyna B, kaspofungina i flukonazol, różniące się mechanizmem działania. Amfoterycyna B wiąże się ze sterolami znajdującymi się na błonie komórkowej grzybów i zwiększa jej przepuszczalność, z kolei flukonazol hamuje produkcję tych związków. Kaspofungina hamuje syntezę beta-(1,3)-D-glukanu będącego składnikiem ściany komórkowej drożdżaków. Zaobserwowano wzrost podatności na działanie tylko amfoterycyny B i kaspofunginy w obecności DNazy I. Dokładnie nie wyjaśniono braku wpływu DNazy

I na aktywność flukonazolu, jednak odpowiedź może tkwić w budowie cząsteczki. Flukonazol, w przeciwieństwie do amfoterycyny B i kaspofunginy, jest związkiem drobnocząsteczkowym, który może łatwo przedostawać się do komórek poprzez macierz, przez co degradacja eDNA za pomocą DNazy I nie zwiększa możliwości jego transportu.

Terapie oparte na działaniu deoksyrybonukleazy

Od momentu odkrycia kluczowej roli pozakomórkowego DNA w utrzymywaniu stabilności biofilmów, podejmowano próby opracowania skutecznych leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy. Do tej pory udowodniono, że DNaza wołowa jest w stanie skutecznie niszczyć strukturę biofilmów mieszanych, tworzonych przez *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* [46]. Odkryto również, że deoksyrybonukleaza NucB pochodząca z *Bacillus licheniformis* umożliwia rozpraszanie biofilmów tworzonych m.in. na protezach tchawiczo-przełykowych [47]. NucB jest cząsteczką mniejszą niż cząsteczka DNazy I, przez co może skuteczniej przedostawać się do głębszych struktur biofilmu i bardziej efektywnie wpływać na jego degradację. W medycynie znalazła zastosowanie rekombinowana ludzka DNaza I (hrDNaza, Dornaza alfa), wykorzystywana w leczeniu mukowiscydozy. Wykazano, że lek ten wpływa również na dyspersję biofilmów tworzonych przez pneumokoki w warunkach *in vivo*, jednak badania *in vivo* nie zostały do tej pory przeprowadzo-

ne [7]. Pomimo tego, że do tej pory przeprowadzono jedynie wstępne badania *in vivo*, nie ulega wątpliwości, że stosowanie leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy lub stosowanie tego enzymu jednocześnie z antybiotykami może stać się skuteczną metodą zwalczania infekcji. Jednak jednym z głównych problemów ograniczających zastosowanie DNazy do celów terapeutycznych jest duża trudność w jej pozyskiwaniu. Przykładowo ludzka rekombinowana DNaza wymaga do swojej aktywności glikozylacji, co uniemożliwia produkowanie jej w systemach bakteryjnych. Przyszłe zastosowanie tego enzymu na szeroką skalę wymaga opracowania wydajnych i tanich sposobów jego pozyskiwania [46].

Podsumowanie

Zjawisko formowania biofilmów przez mikroorganizmy od lat budzi zainteresowanie badaczy z całego świata. Coraz więcej uwagi poświęca się badaniu funkcji poszczególnych elementów wchodzących w skład zewnątrzkomórkowej macierzy. Szczególnie interesującym jej składnikiem jest poza-komórkowe DNA, którego zewnątrzkomórkowa funkcja po raz pierwszy została odkryta w 2002 roku podczas badań prowadzonych nad biofilmem bakteryjnym tworzonym przez *P. aeruginosa*. Od tego czasu eDNA jest uważane za jeden z głównych składników biofilmów prokariotycznych i eukariotycznych, którego zadaniem jest przede wszystkim utrzymywanie integralności powstałej struktury. Pomimo

dość obszernej wiedzy na temat roli i mechanizmów uwalniania DNA u bakterii, wciąż mało uwagi poświęca się biofilmom o podłożu grzybiczym i mieszanym. Większość dotychczasowych badań prowadzona była na modelowych biofilmach jednogatunkowych, które występują bardzo rzadko w warunkach naturalnych. Konieczne są zatem dalsze prace umożliwiające przede wszystkim poznanie podstaw zakażeń o podłożu wielogatunkowym, gdyż to właśnie one są odpowiedzialne za rozwój najpoważniejszych infekcji. Na podstawie aktualnego stanu wiedzy wydaje się, że opracowanie leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy, umożliwiających degradację eDNA, może stać się obiecującą metodą zwalczania biofilmów o podłożu bakteryjno-grzybiczym wywołujących poważne infekcje, będące jedną z przyczyn wysokiej śmiertelności osób cierpiących na przykład na mukowiscydozę czy zespół nabytego niedoboru odporności.

Bibliografia:

- [1] L. A. Pratt and R. Kolter, "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili," *Mol. Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 285–293, 1998.
- [2] I. W. Sutherland, "Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework," *Microbiology*, vol. 147, no. 1, pp. 3–9, 2001.
- [3] E. Karatan and P. Watnick, "Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 73, no. 2, pp. 310–347, 2009.
- [4] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, and H. O. Sintim, "Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents," *Future Med. Chem.*, vol. 7, no. 4, pp. 493–512, 2015.
- [5] D. Romero, C. Aguilar, R. Losick, and R. Kolter, "Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 5, pp. 2230–2234, 2010.
- [6] C. B. Whitchurch et al., "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation" *Science* (80-.), vol. 295, no. 5559, pp. 0–1, 2002.
- [7] L. Hall-Stoodley et al., "Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates," *BMC Microbiol.*, vol. 8, no. 1, p. 173, 2008.
- [8] S. Vilain, J. M. Pretorius, J. Theron, and V. S. Brözel, "DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 9, pp. 2861–2868, 2009.
- [9] M. Allesen-Holm et al., "A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms," *Mol. Microbiol.*, vol. 59, no. 4, pp. 1114–1128, 2006.
- [10] L. Yang, K. B. Barken, M. E. Skindersoe, A. B. Christensen, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen, "Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*," *Microbiology*, vol. 153, no. 5, pp. 1318–1328, 2007.
- [11] T. Das and M. Manefield, "Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa*," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, pp. 1–8, 2012.
- [12] J. P. Dillard and H. S. Seifert, "A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates," *Mol. Microbiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 263–277, 2001.
- [13] H. L. Hamilton, N. M. Domínguez, K. J. Schwartz, K. T. Hackett, and J. P. Dillard, "*Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA

via a novel type IV secretion system," *Mol. Microbiol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1704-1721, 2005.

[14] S. R. Schooling and T. J. Beveridge, "Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 16, pp. 5945-5957, 2006.

[15] S. Liao et al., "Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery," *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 13, pp. 2355-2366, 2014.

[16] S. Molin and T. Tolker-Nielsen, "Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 255-261, 2003.

[17] P. Courvalin, "Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, no. 7, pp. 1447-1451, 1994.

[18] L. Montanaro et al., "Extracellular DNA in biofilms," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 34, no. 9, pp. 824-831, 2011.

[19] L. Kausmally, O. Johnsborg, M. Lunde, E. Knutsen, and L. S. Håvarstein, "Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 13, pp. 4338-4345, 2005.

[20] F. C. Petersen, D. Pecharki, and A. A. Scheie, "Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 18, pp. 6327-6331, 2004.

[21] S. Hannan, D. Ready, A. S. Jasni, M. Rogers, J. Pratten, and A. P. Roberts, "Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 345-349, 2010.

[22] J. Chandra et al., "Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Develop-

ment, Architecture, and Drug Resistance," *Natl. Review Microbiol.*, vol. 9, no. 18, pp. 109-118, 2001.

[23] M. A. Al-Fattani and L. J. Douglas, "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance," *J. Med. Microbiol.*, vol. 55, no. 8, pp. 999-1008, 2006.

[24] M. Martins et al., "Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms," *Mycopathologia*, vol. 169, no. 5, pp. 323-331, 2010.

[25] E. M. Kojic and R. O. Darouiche, "Candida Infections of Medical Devices," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 17, no. 2, pp. 255-267, 2004.

[26] C. J. Nobile, J. E. Nett, D. R. Andes, and A. P. Mitchell, "Function of *Candida albicans* adhesin hwp1 in biofilm formation," *Eukaryot. Cell*, vol. 5, no. 10, pp. 1604-1610, 2006.

[27] F. Li and S. P. Palecek, "EAP1, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells," *Eukaryot. Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 1266-73, 2003.

[28] P. W. J. de Groot, O. Bader, A. D. de Boer, M. Weig, and N. Chauhan, "Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick," *Eukaryot. Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 470-481, 2013.

[29] R. Rajendran, C. Williams, D. F. Lappin, O. Millington, and M. Martins, "Extracellular DNA Release Acts as an Antifungal Resistance Mechanism in Mature *Aspergillus fumigatus* Biofilms," *Eukaryot. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 420-429, 2013.

[30] B. Sapaar et al., "Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 6, pp. 1531-1542, 2014.

[31] J. M. Hornby et al., "Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol" *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 7, pp. 2982-2992, 2001.

- [32] M. Kruppa et al., "The Two-Component Signal Transduction Protein Chk1p Regulates Quorum Sensing in *Candida albicans*," *Eukaryot Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 1062-1065, 2004.
- [33] R. Rajendran et al., "Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation," *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 1, p. 303, 2014.
- [34] S. Selvaggini, C. A. Munro, S. Paschoud, D. Sanglard, and N. A. R. Gow, "Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbiology*, vol. 150, no. 4, pp. 921-928, 2004.
- [35] S. Schlafer, R. L. Meyer, I. Dige, and V. R. Regina, "Extracellular DNA contributes to dental biofilm stability," *Caries Res.*, vol. 51, no. 4, pp. 436-442, 2017.
- [36] M. Pammi, R. Liang, J. Hicks, T. Mistretta, and J. Versalovic, "Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*" *BMC Microbiol.*, vol. 13, no. 257, pp. 257-269, 2013.
- [37] K. H. Groicher, B. A. Firek, D. F. Fujimoto, and K. W. Bayles, "The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 7, pp. 1794-1801, 2000.
- [38] G. Pietrocola et al., "Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 34, no. 9, pp. 799-810, 2011.
- [39] J. I. Fuxman Bass et al., "Extracellular DNA: A Major Proinflammatory Component of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 11, pp. 6386-6395, 2010.
- [40] J. Chandra, T. S. McCormick, Y. Imamura, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum, "Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines," *Infect. Immun.*, vol. 75, no. 5, pp. 2612-2620, 2007.
- [41] H. Phagocytes et al., "Interactions between Human Phagocytes and *Candida albicans* Biofilms Alone and in Combination with Antifungal Agents," *J Infect Dis.*, vol. 201, no. 12, pp. 1941-1949, 2011.
- [42] J. W. Costerton, "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections," *Science* (80-.), vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, 1999.
- [43] H. Mulcahy, L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza, "Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 11, p. e1000213, 2008.
- [44] B. Adam, G. S. Baillie, and L. J. Douglas, "Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*," *J. Med. Microbiol.*, vol. 51, no. MAY, pp. 344-349, 2002.
- [45] J. B. McPhee, S. Lewenza, and R. E. W. Hancock, "Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*," *Mol. Microbiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 205-217, 2003.
- [46] N. S. Jakubovics, R. C. Shields, N. Rajarajan, and J. G. Burgess, "Life after death: The critical role of extracellular DNA in microbial biofilms," *Lett. Appl. Microbiol.*, 2013.
- [47] A. Shakir, M. R. Elbadawey, R. C. Shields, N. S. Jakubovics, and J. G. Burgess, "Removal of biofilms from tracheoesophageal speech valves using a novel marine microbial deoxyribonuclease," *Otolaryngol. - Head Neck Surg. (United States)*, vol. 147, no. 3, pp. 509-514, 2012.